

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年1 月8 日 (08.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/002501 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 35/74, (74) 代理人: 酒井 一, 外(SAKAI,Hajime et al.); 〒102-0083 東京都千代田区麹町5丁目7番地 秀和紀尾井町TBRビル Tokyo (JP).  
A61P 11/02, 11/06, 17/00, 37/08, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008094
- (22) 国際出願日: 2003 年6 月26 日 (26.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-185897 2002 年6 月26 日 (26.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): カルピス株式会社 (CALPIS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西2-2-3 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山本 直之 (YAMAMOTO,Naoyuki) [JP/JP]; 〒229-0006 神奈川県相模原市淵野辺5-1-10 カルピス株式会社基盤技術研究所内 Kanagawa (JP). 石田 優 (ISHIDA,Yuu) [JP/JP]; 〒229-0006 神奈川県相模原市淵野辺5-1-10 カルピス株式会社基盤技術研究所内 Kanagawa (JP). 板東 出樹 (BANDO,Izuki) [JP/JP]; 〒229-0006 神奈川県相模原市淵野辺5-1-10 カルピス株式会社品質保証部内 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIALLERGIC AGENT, UTILIZATION THEREOF FOR REDUCING ALLERGY AND METHOD OF REDUCING ALLERGY

(54) 発明の名称: 抗アレルギー剤、アレルギー低減のためのその使用及びアレルギー低減方法

(57) Abstract: It is intended to provide an antiallergic agent which contains as the active ingredient lactic acid bacterium/ bacteria selected from the group consisting of a lactic acid bacterium belonging to *Lactobacillus acidophilus*, a lactic acid bacterium belonging to *Lactobacillus fermentum* and a combination thereof. This antiallergic agent can reduce the amount of IgE antibody participating in the onset of type I allergy and thus relieves allergic constitution. Moreover, it can be easily taken and has a high safety. It is also intended to provide utilization of the above antiallergic agent for reducing allergy and a method of reducing antiallergic agent with the use of the antiallergic agent.

(57) 要約: ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ファーマンタム (*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される乳酸菌を有効成分として含む抗アレルギー剤が提供される。当該抗アレルギー剤は、I型アレルギーの発症に関わるIgE抗体量を減少させてアレルギー体質を改善することができ、容易に摂取でき、かつ安全性が高い。また、アレルギー低減のための当該抗アレルギー剤の使用及び当該抗アレルギー剤を用いたアレルギーを低減する方法も提供される。

## 明細書

## 5 抗アレルギー剤、アレルギー低減のためのその使用及びアレルギー低減方法

## 技術分野

本発明は、抗アレルギー剤に関する。また本発明は、アレルギー低減のためのその使用及  
10 びアレルギーを低減する方法に関する。

## 背景技術

日本等の多くの国では、アレルギー患者は年々増加しており、成人の3人に1人は何らかの  
アレルギー疾患であるといわれている。アレルギー疾患は作用機序によりI型～IV型と大き  
15 く4タイプに分類されている。花粉症などのアレルギー性鼻炎や、気管支喘息、アトピー性  
皮膚炎の一部は、免疫グロブリンE (IgE) 依存性のI型アレルギーといわれるものであり、  
血中の抗原特異的IgE抗体が増加するとアレルギー症状を引き起こすリスクが高くなる。

I型アレルギーの発症機構について述べる。体内に侵入した花粉やハウスダスト、ダニな  
どの抗原に対する特異的IgE抗体が産生され、マスト細胞や血中の好塩基球表面のFcεレセ  
20 プターに結合することで感作された状態となる。その後さらに抗原が体内に侵入すると、抗  
原がIgE抗体に結合し、複合体が形成されることで脱顆粒を引き起こし、顆粒中のヒスタミ  
ンやロイコトリエンなどの化学伝達物質が放出され、これらの作用によりアレルギー症状が  
現れる。

今日アレルギー疾患の治療に主に用いられているのは、抗ヒスタミン剤に代表される化学  
25 伝達物質の拮抗剤と、抗炎症剤として用いられるステロイド剤である。しかしいずれも対症  
療法にすぎず、ステロイド剤については免疫反応全体を抑制してしまうために副作用が伴う。  
また脱顆粒抑制による化学伝達物質遊離抑制剤も用いられているが、発症の主な因子である  
IgE抗体を特異的に減少させるような根本的な治療薬は現在のところない。

また、抗アレルギー剤は、長期間連用する必要が生じるので、容易に摂取でき、且つ安全性が高いものが望まれる。従って、そのような特性を有しうる新たな抗アレルギー剤が求められている。

## 5 発明の開示

本発明の目的は、I型アレルギーの発症に関わるIgE抗体量を減少させてアレルギー体質を改善することができ、容易に摂取でき、かつ安全性が高い抗アレルギー剤、及びアレルギーの低減方法を提供することにある。

上記課題を解決するために、本願発明者らは、大きなIgGの増加を伴わず、顕著に抗原特異的IgEが増加したマウスモデルを構築し、そのモデルにおいて、腸管免疫系に影響を及ぼしうる各種の乳酸菌菌株のIgE量抑制作用を検討したところ、各種の乳酸菌のうち特定のものが、特に優れたIgE産生抑制作用を有することを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明によれば、ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される乳酸菌を有効成分として含む抗アレルギー剤が提供される。

また、本発明によれば、前記ラクトバチルス・アシドフィラスに属する乳酸菌がラクトバチルス・アシドフィラスCL0062株（特許生物寄託センター寄託番号FERM BP-4980）、CL92株（特許生物寄託センター寄託番号FERM BP-4981）及びこれらの組み合わせからなる群より選択されるものである前記抗アレルギー剤が提供される。

さらに、本発明によれば、前記ラクトバチルス・ファーメンタムに属する乳酸菌がラクトバチルス・ファーメンタムCP34株（特許生物寄託センター寄託番号FERM BP-8383）である前記抗アレルギー剤が提供される。

さらに、本発明によれば、持続的に鼻部に抗原刺激をすることにより血中の抗原特異的IgE抗体を増加させた鼻炎モデルマウスにおいて、経口投与により血中の抗原特異的IgE抗体を減少させることを特徴とする前記抗アレルギー剤が提供される。

さらに、本発明によれば、アレルギーを低減するための医薬の製造における前記特定の乳酸菌の使用が提供される。

さらに、本発明によれば、アレルギーを低減するであって、かかる低減を必要とする被検者に、有効用量の前記抗アレルギー剤を投与する工程を含む、アレルギーを低減する方法が提供される。

#### 5 図面の簡単な説明

図1は、実施例1における、高IgEマウスの血中免疫グロブリン量の変化を示すグラフである。

図2は、実施例2における、高IgEマウスに対する発酵乳投与によるOVA-IgE量抑制の実験結果を示すグラフである。

10 図3は、実施例3における、高IgEマウスに対する発酵乳投与によるOVA-IgE量抑制の実験結果を示すグラフである。

図4は、実施例4における、高IgEマウスに対する発酵乳投与によるOVA-IgE量抑制の実験結果を示すグラフである。

15 図5は、実施例5における、ヒトに対する発酵乳投与によるアレルギー抑制の実験結果を示すグラフである。

図6は、実施例5における、ヒトに対する発酵乳投与によるアレルギー抑制の実験結果を示すグラフである。

#### 発明を実施するための形態

20 本発明の抗アレルギー剤は、ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される乳酸菌を有効成分として含む。

25 ラクトバチルス・アシドフィラスに属する乳酸菌としては、ラクトバチルス・アシドフィラスCL0062株(特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1-1-1中央第6)寄託番号FERM BP-4980、寄託日1994年3月4日)、CL92株(特許生物寄託センター寄託番号FERM BP-4981、寄託日1994年3月4日)又はこれらの組み合わせが特に好ましい。また、ラクトバチルス・ファーメンタムに属する乳酸菌としては、ラクトバチルス・ファーメンタムCP34株(特許生物

寄託センター寄託番号FERM BP-8383、寄託日2002年5月23日) が特に好ましい。これら3つの菌株は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基き受託されている。ラクトバチルス・ファーマメンタムCP34株株の公衆利用可能性に関する全ての制限は、特許の許可により解除される。また、ラクトバチルス・アシドフィラスCL0062株及び

5 CL92株は現在既に、公衆により利用可能となっている。

ラクトバチルス・アシドフィラスCL0062株は、以下の菌学的性質を有する。

(形態学的性質)

1) 細胞の形：桿菌、2) 運動性の有無：無、3) 胞子の有無：無、4) グラム染色：陽性

(生理学的性質)

- 10 1) カタラーゼ：陰性、2) インドールの生成：陰性、3) 硝酸塩の還元：陰性、4) 酸素に対する態度：通性嫌気性、5) 15℃で生育：無、6) グルコースからホモ乳酸発酵によりDL乳酸生成、ガス産生無
- 7) 各種糖類から酸生成の有無
- グルコース + メリビオース +
- 15 ラクトース + ラフィノース +
- マンノース + マンニトール -
- フラクトース + ソルビトール -
- ガラクトース + エスクリン +
- シュークロース + サリシン +
- 20 アラビノース - N-アセチルグルコサミン +
- マルトース + アミグダリン +
- キシロース - ゲンチオビオース +
- ラムノース - メレチトース -
- セロビオース + デキストリン +
- 25 トレハロース + スターチ -。

ラクトバチルス・アシドフィラスCL92株は、以下の菌学的性質を有する。

(形態学的性質)

1) 細胞の形：桿菌、2) 運動性の有無：無、3) 胞子の有無：無、4) グラム染色：陽性  
(生理学的性質)

1) カタラーゼ：陰性、2) インドールの生成：陰性、3) 硝酸塩の還元：陰性、4) 酸素  
に対する態度：通性嫌気性、5) 15℃で生育：無、6) グルコースからホモ乳酸発酵によ

5 りDL乳酸生成、ガス産生無

7) 各種糖類から酸生成の有無

グルコース + メリビオース -

ラクトース + ラフィノース +

マンノース + マンニトール -

10 フラクトース + ソルビトール -

ガラクトース + エスクリン +

シュークロース + サリシン +

アラビノース - N-アセチルグルコサミン +

マルトース + アミグダリン +

15 キシロース - ゲンチオビオース +

ラムノース - メレチトース -

セロビオース + デキストリン -

トレハロース + スターチ -。

20 ラクトバチルス・ファーマンタムCP34は、以下の菌学的性質を有する。

(形態学的性質)

1) 細胞の形：桿菌、2) 運動性の有無：無、3) 胞子の有無：無、4) グラム染色：陽性  
(生理学的性質)

1) カタラーゼ：陰性、2) 酸素に対する態度：通性嫌気性、3) グルコースからDL乳酸  
25 生成し、ガス産生 (+)

4) 各種炭水化物の分解性

アラビノース - セロビオース -

キシロース - ラクトース +

	メリピオース	—	トレハロース	—
	ラムノース	—	アミグダリン	—
	リボース	+	ラフィノース	—
	グルコース	+	メレチトース	—
5	マンノース	—	マンニトール	—
	フラクトース	+	ソルビトール	—
	シュークロース	+	エスクリン	—
	マルトース	+	サリシン	—。

- 10 本発明の抗アレルギー剤中の、前記乳酸菌の含有割合は、特に限定されず製造の容易性や好ましい一日投与量等に応じて適宜調節しうるが、例えば剤型が液体の場合 $1 \times 10^7$  cells/ml $\sim 1 \times 10^{10}$  cells/mlとすることが好ましい。

本発明の抗アレルギー剤は、前記乳酸菌に加え、他の成分を含むことができる。他の成分としては、賦形剤等の添加剤、及び後述する培地の成分等を挙げることができる。

- 15 本発明の抗アレルギー剤は、前記乳酸菌を培地において培養することにより製造することができる。

培養に用いる培地は、前記乳酸菌が生育可能な培地であればどのようなものでも利用可能であり、獣乳、脱脂乳、乳性ホエー、MRS培地、GAM培地、BL培地、Briggs Liver Brothや合成培地などを用いることができる。培養温度は25℃から50℃、好ましくは35℃から42℃とす

- 20 ることができる。また、培養時間は3時間から48時間、好ましくは8時間から12時間とすることができる。培養終了後の培地をそのまま、又は必要に応じてさらに処理することにより本発明の抗アレルギー剤とすることができる。例えば、培養終了後の培地から遠心分離、ろ過等により集菌して菌体のみとしたもの、これを凍結乾燥菌体としたもの、さらに加熱処理した菌体、菌体破碎物等も本発明の抗アレルギー剤とすることができる。また、上記のものを
- 25 さらに製剤化したものや、飲料、錠剤、ペースト、パンなど様々な食品素材に配合したもの等も、本発明の抗アレルギー剤とすることができる。

本発明の抗アレルギー剤の投与方法は、特に限定されないが経口投与が好ましい。投与量は、例えばヒトへの経口投与の場合、菌体数として $2 \times 10^9$ 個/日以上、好ましくは $2 \times 10^{10}$

個/日とすることができ、1日1回投与、または複数回の分与とすることもできる。

本発明の抗アレルギー剤は、後述する実施例において確認されたとおりIgE抗体量を効果的に抑制することができる一方、食品として摂取されている菌体を有効成分とするため、安全性は高いものと思われる。

- 5     本発明のアレルギー低減方法は、かかる低減を必要とする被検者に、有効用量の前記抗アレルギー剤を投与する工程を含む。被検者としては、ヒト及びその他の哺乳類等の動物を挙げることができる。

10     本発明の抗アレルギー剤は、生体中のIgE抗体量を効果的に減少させることができる一方、容易に摂取でき、且つ安全性が高い。したがって、IgE抗体量の過剰が関与するアレルギーの抑制に有用である。

#### 実施例

以下に本発明を実施例を参照してより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

#### 15     実施例1

##### （高IgEマウスの作成）

BALB/c系雄マウスを日本チャールスリバー社から購入し、飼料としてCE-2（日本クレア社製）を自由摂取させ飼育した。卵白アルブミン（以下、OVAと略す。シグマ社製）10 $\mu$ g及びアジュバントとして水酸化アルミニウム（和光純薬株式会社製）2mgを生理食塩水300  
20      $\mu$ lに懸濁した。この懸濁液を、6週齢の上記マウス10匹のそれぞれに、感作開始日及び4日目に腹腔内投与し、一次感作を行った。二次感作として、OVAが25mg/mlとなるよう生理食塩水に溶解したOVA抗原溶液にマウスの鼻を約3秒間浸した。この操作を1回につき3度繰り返し、1日に2回行った。これを10～16日目まで毎日行ない、高IgEマウスを得た。

25     この高IgEマウスの眼底静脈より、感作開始日及び17日目に部分採血し、採取した血液より血清サンプルを得た。この血清サンプル中の、OVA特異的IgE（以下、OVA-IgEと略す）、総IgE及び総IgGを、下記の測定方法により測定した。結果を図1(a)～図1(c)に示す。

図1(a)～1(c)の結果より、感作により血中の総IgE及びOVA-IgEが増加量がIgG増加量に対して著しく大きいことが分かる。このようにして、免疫機能を全体的に変動させることな



く、血中IgE及び抗原特異的血中IgEが増加したアレルギーモデルマウスが構築された。

(血中OVA-IgEの測定)

- 5 サンドイッチELISA法によって行った。96穴イムノプレート (コーニング社製) の各ウェルにヒツジ抗マウスIgEポリクローナル抗体 (商品名「AAM11」、大日本製薬株式会社製) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む生理食塩水溶液を100  $\mu\text{l}$ 加えて、4°Cで一晩インキュベートした。プレートをリン酸緩衝液 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 及び1.5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を含む。以下PBSと略す。) で3回洗浄した後、0.5%カゼイン含有PBSをウェルいっぱいに加えて、室温で3時間インキュベートし、PBSで3回洗浄した。PBSで1/10に希釈した血清サンプル100  $\mu\text{l}$ を各ウェルに加え、4°Cで一晩反応させた。PBSで4回洗浄し、ビオチン化キット (アメリカン・コー
- 10 レックス社製) でビオチン化したOVA (ビオチンラベルOVA) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む0.5%カゼイン含有PBS溶液を各ウェルに100  $\mu\text{l}$ 加えて室温で2時間反応後、PBSで5回洗浄した。ストレプトアビジンペルオキシダーゼ (シグマ社製) 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びカゼイン0.5%を含むPBS溶液を各ウェルに100  $\mu\text{l}$ 加えて室温で1時間反応させた。プレートを0.1%Tween20含有PBSで5回洗浄した後、2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (以下ABTSと略す。
- 15 ベーリンガーマンハイム社製) 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び過酸化水素0.006%を含む0.2Mクエン酸緩衝液 (0.2Mクエン酸と0.2Mクエン酸三ナトリウムとを混合してpH5としたもの) を各ウェルに100  $\mu\text{l}$ 加えて37°Cで3時間遮蔽して発色反応した。反応後、 $\text{OD}_{405}$ と $\text{OD}_{492}$ を測定し、 $\text{OD}_{405}$ 値- $\text{OD}_{492}$ 値を用いて真の発色値とした。

- 一方、OVA25mg/mlを含む生理食塩水を5回 (1回/週) 腹腔内投与したマウスの血液を
- 20 採血し、これから血清を調製し、スタンダード血清とした。このスタンダード血清をPBSで1/10に希釈した。この希釈液をさらに未免疫血清で2倍に希釈する操作を段階的に行い、検量線作成用の希釈液を調製した。これらの希釈液について、上記と同様の操作を行い発色値を測定し、検量線を得た。この検量線に基づき、血清サンプル中のOVA-IgE量を、スタンダード血清中のOVA-IgE量を1とした相対量で求めた。

- 25 (血中総IgEの測定)

96穴イムノプレート (コーニング社製) の各ウェルにヒツジ抗マウスIgEポリクローナル抗体 (商品名「AAM11」、大日本製薬株式会社製) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む生理食塩水溶液を50  $\mu\text{l}$ 加えて、4°Cで一晩インキュベートした。プレートをPBSで3回洗浄した後、0.5%カゼイン含

有PBSをウェルいっぱいに加えて、室温で3時間インキュベートし、PBSで3回洗浄した。0.5%カゼイン含有PBSで1/25に希釈した血清サンプル50  $\mu$ lを各ウェルに加え、4°Cで一晩反応させた。PBSで4回洗浄し、ビオチンラベル抗マウスIgE抗体（ヤマサ醤油株式会社製）2  $\mu$ g/ml及びカゼイン0.5%を含むPBS溶液を各ウェルに50  $\mu$ l加えて2時間室温で反応させた。

- 5 0.1%Tween20含有PBSで5回洗浄後、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ1  $\mu$ g/ml及びカゼイン0.5%を含むPBS溶液を各ウェルに50  $\mu$ l加えて室温で1時間反応させた。プレートを0.1%Tween20含有PBSで5回洗浄した後、ABTS 300  $\mu$ g/ml及び過酸化水素0.006%を含む0.2Mクエン酸緩衝液(pH5)を各ウェルに50  $\mu$ l加えて、室温で20~30分間遮蔽して反応させ、OD<sub>405</sub>を測定した。

- 10 一方、血清サンプルの代わりに、マウス抗DNP-IgE（ヤマサ醤油株式会社製）を、カゼイン0.5%を含むPBSに種々の濃度で溶解したものをを用いて上記と同様に操作し、検量線を得た。この検量線に基き、血清サンプル中の総IgE量を算出した。

（血中総IgGの測定）

- 96穴イムノプレート（コーニング社製）の各ウェルにヤギ抗マウスIgG(H+L)抗体（商品名  
15 「62-6500」、ザイメット社製）1  $\mu$ g/mlを含む生理食塩水溶液を50  $\mu$ l加えて、4°Cで一晩インキュベートした。プレートをPBSで3回洗浄した後、0.5%カゼイン含有PBSをウェルいっぱいに加えて、室温で3時間インキュベートし、PBSで3回洗浄した。0.5%カゼイン含有PBSで1/1000に希釈した血清サンプル50  $\mu$ lを加え、4°Cで一晩反応させた。PBSで4回洗浄し、ペルオキシダーゼラベル抗マウスIgG( $\gamma$ )抗体（カッペル社製）2  $\mu$ g/ml及びカゼイン0.5%  
20 を含むPBS溶液を各ウェルに50  $\mu$ l加えて2時間室温で反応させた。0.1%Tween20含有PBSで5回洗浄後、ABTS 300  $\mu$ g/ml及び過酸化水素0.006%を含む0.2Mクエン酸緩衝液(pH5)を各ウェルに50  $\mu$ l加えて、室温で20~30分間遮蔽して反応させ、OD<sub>405</sub>を測定した。

- 一方、血清サンプルの代わりに、精製したマウスIgG（カッペル社製）を、カゼイン0.5%を含むPBSに種々の濃度で溶解したものをを用いて上記と同様に操作し、検量線を得た。この  
25 検量線に基き、上記血清サンプル中の総IgG量を算出した。

## 実施例2

（各種乳酸菌の効果の比較）

表1に示す乳酸菌菌株のそれぞれを、MRS培地で37°Cで一晩前培養し、3000rpmで10分間の遠心分離により菌体を回収した。この菌体を、9% (W/V) 還元脱脂乳 (0.1% (W/V) 酵母エキス (DIFCO社製) を含む) に添加し、37°Cで乳が凝固するまで発酵させ、発酵終了後、各発酵乳の総菌数を測定した。結果を表1に示す。

5

表1

株名	総菌数 (cells/ml)
ラクトバチルス・アシドフィラスCL92 (BP-4981)	$1.9 \times 10^8$
ラクトバチルス・ブルガリカスCP1812	$1.5 \times 10^8$
ラクトバチルス・ファーメンタムCP34	$5.3 \times 10^8$
ラクトバチルス・ヘルベティカスCP790	$2.4 \times 10^8$
ラクトバチルス・ジョンソニーCP2551	$2.7 \times 10^8$
ラクトバチルス・プランタラムCP2172	$5.9 \times 10^8$
ラクトバチルス・ラムノサスATCC53103	$1.0 \times 10^8$

次に、実施例1と同様の手順で高IgEマウスを作製し、感作18日目に血中OVA-IgEを実施例1と同様の測定方法にて測定した。血中OVA-IgE量が均等になるよう一群10匹ずつにマウスを振り分けた。各群のマウスに、感作19日目～21日目にわたり、上記の各種発酵乳、発酵させていない9% (W/V) 還元脱脂乳、又はシクロホスファミドを750  $\mu$ g含む発酵させていない9w/v%還元脱脂乳を1日につき1ml、3日間胃ゾンデにより強制投与した。感作開始22日目に、これらのマウスの眼底静脈から採血し、血清を調製し、血中OVA-IgE及び総IgG量を測定した。また、対照として、同様に感作を行ったが発酵乳等の投与は何も行わなかったマウスについても、同様に採血し、血中OVA-IgE及び総IgG量を測定した。結果を図2に示す。

15

図2に示される通り、ラクトバチルス・アシドフィラス又はラクトバチルス・ファーメンタム発酵乳を投与した群においては、OVA-IgE量に関して、発酵させていない脱脂乳に比べて有意な抑制効果が得られた ( $p < 0.01$ )。一方血中総IgG量に関しては有意な差異は認められなかった(図示せず)。

20

### 実施例3

乳酸菌菌株として表2に示すものを用いた他は、実施例2と同様に操作した。各発酵乳中の総菌数の測定結果を表2に示す。また、血中OVA-IgEの測定結果を図3に示す。

5

表2

株名	総菌数 (cells/ml)
ラクトバチルス・アシドフィラスCL0062 (BP-4980)	$4.40 \times 10^8$
ラクトバチルス・ガッセリーCP2209	$4.30 \times 10^8$
ラクトバチルス・ロイテリATCC23272	$9.60 \times 10^8$
ビフィドバクテリウム・ブレベCP2425	$1.30 \times 10^8$

図3に示される通り、ラクトバチルス・アシドフィラス発酵乳を投与した群においては、OVA-IgE量に関して、発酵させていない脱脂乳に比べて有意な抑制効果が得られた ( $p < 0.01$ )。

10 一方血中総IgG量に関しては有意な差異は認められなかった(図示せず)。

### 実施例4

(低用量での効果の確認)

15 ラクトバチルス・アシドフィラスCL92株とラクトバチルス・ファーマンタムCP34株のそれぞれをMRS培地で37°Cで一晩前培養した。3000rpmで10分間の遠心分離により菌体を回収してMRS培地に添加し、37°Cで一晩本培養し、再び3000rpmで10分間の遠心分離により菌体を回収した。それぞれ菌数を測定して、1mlあたり  $1 \times 10^6$  個となるように9%脱脂乳に菌体を懸濁し、懸濁液を調製した。

次に、実施例1と同様の手順で高IgEマウスを作製し、感作18日目に血中OVA-IgEを実施  
20 例1と同様の測定方法にて測定した。血中OVA-IgE量が均等になるよう一群10匹ずつにマウスを振り分けた。各群のマウスに、感作19日目～21日目にわたり、上記の懸濁液を1日につき1ml、3日間胃ゾンデにより強制投与した。感作開始22日目に、これらのマウスの眼底

静脈から採血し、血清を調製し、血中OVA-IgE及び総IgG量を測定した。結果を図4に示す。

図4に示される通り、ラクトバチルス・アシドフィラスCL92株及びラクトバチルス・ファーマメンタムCP34株のいずれを投与した群においても、OVA-IgE量に関して、発酵させていない脱脂乳に比べて有意な抑制効果が得られた。一方血中総IgG量に関しては有意な差異は認められなかった(図示せず)。

5

発酵させていない脱脂乳を試料とした際のOVA-IgE量のスタンダード比をa、各懸濁液を試料とした際のOVA-IgEのスタンダード比をbとすると、各懸濁液中を投与した場合のOVA-IgEの減少率dは、式 $d=1-(b/a)$ により求められる。投与した懸濁液中の菌濃度をs(cells/ml)とし、sと減少率dとが比例すると仮定すると、この実験系においてOVA-IgEを半減させるのに  
10 必要な懸濁液中の菌数x(cells/ml)は、式 $x=(s \times 0.5)/d$ で求められる。この式に基づいて、実施例2～3で用いた各菌株における菌数xを求めた。結果を表3に示す。

表3

株名	必要菌数 (cells/ml)
ラクトバチルス・アシドフィラスCL92 (BP-4981)	$1.0 \times 10^6$
ラクトバチルス・ブルガリカスCP1812	$2.0 \times 10^8$
ラクトバチルス・ファーマメンタムCP34	$1.4 \times 10^6$
ラクトバチルス・ヘルベティカスCP790	$3.3 \times 10^8$
ラクトバチルス・ジョンソニーCP2551	$3.5 \times 10^8$
ラクトバチルス・プランタラムCP2172	$7.0 \times 10^8$
ラクトバチルス・ラムノサスATCC53103	$2.9 \times 10^8$
ラクトバチルス・アシドフィラスCL0062 (BP-4980)	$5.0 \times 10^8$
ラクトバチルス・ガッセリーCP2209	$3.1 \times 10^8$
ラクトバチルス・ロイテリATCC23272	$3.3 \times 10^8$
ビフィドバクテリウム・ブレベCP2425	$1.1 \times 10^9$

## 15 実施例5

(ヒト臨床効果)

通年性アレルギー性鼻炎に罹患して症状を呈している13名の被験者（平均年齢22.9±6.1歳、男性6名、女性7名）に、2週間の観察期間の後、ラクトバチルス・アシドフィラスCL92株を $8.0 \times 10^8 \sim 1.3 \times 10^9$  cell/ml含む発酵乳を100ml/日ずつ4週間摂取させた。経時的に自覚症状に関するアンケートをとり、これを元に日本アレルギー学会「アレルギー性鼻炎重症度分類」に従って症状をスコア化した。また、経時的に鼻炎症状を、日本アレルギー学会ガイドラインの基準に従って診断した。また、経時的に採血し、血液中のIgE抗体価を測定した。さらに、試験期間中の最低気温を記録した。試験期間中の被験者の鼻閉の重症度、鼻をかんだ回数及び最低気温を図5及び図6に示す。

試験期間の最低気温の変化が激しく、摂取期間開始日（11月15日）の14℃から、摂取期間終了日（12月13日）の3.7℃まで10℃以上低下し、鼻炎症状は悪化しやすい条件であったにもかかわらず、鼻閉は摂取開始2週間後に改善傾向が見られ（Wilcoxon test:  $p < 0.1$ ）、摂取開始4週間後には有意な改善を認めた（Wilcoxon test:  $p < 0.05$ ）。鼻かみ回数においても摂取開始3週間後に減少傾向が見られた（Wilcoxon test:  $p < 0.1$ ）。また、摂取期間中、くしゃみ回数の減少、下鼻甲介の腫脹の軽快、及び血中総IgE抗体価の低下の傾向が見られた。

## 請求の範囲

1. ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラ  
クトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれら  
5 の組み合わせからなる群より選択される乳酸菌を有効成分として含む抗アレルギー剤。
2. 前記ラクトバチルス・アシドフィラスに属する乳酸菌がラクトバチルス・アシドフィラ  
スCL0062株 (特許生物寄託センター寄託番号FERMBP-4980)、CL92株 (特許生物寄託センタ  
ー寄託番号FERMBP-4981) またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるものである  
10 請求項1記載の抗アレルギー剤。
3. 前記ラクトバチルス・ファーメンタムに属する乳酸菌がラクトバチルス・ファーメンタ  
ムCP34株 (特許生物寄託センター寄託番号FERMBP-8383) である請求項1記載の抗アレルギー  
剤。
- 15 4. 前記乳酸菌が、持続的に鼻部に抗原刺激をすることにより血中の抗原特異的IgE抗体を  
増加させた鼻炎モデルマウスにおいて、経口投与により血中の抗原特異的IgE抗体を減少さ  
せうる乳酸菌であることを特徴とする請求項1記載の抗アレルギー剤。
- 20 5. アレルギーを低減するための医薬の製造における、ラクトバチルス・アシドフィラス  
(*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ファーメンタム  
(*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれらの組み合わせからなる群より選  
択される乳酸菌の使用。
- 25 6. 前記ラクトバチルス・アシドフィラスに属する乳酸菌がラクトバチルス・アシドフィラ  
スCL0062株 (特許生物寄託センター寄託番号FERMBP-4980)、CL92株 (特許生物寄託センタ  
ー寄託番号FERMBP-4981) またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるものである  
請求項5記載の使用。

7. 前記ラクトバチルス・ファーメンタムに属する乳酸菌がラクトバチルス・ファーメンタムCP34株（特許生物寄託センター寄託番号FERM BP-8383）である請求項5記載の使用。

- 5 8. 前記乳酸菌が、持続的に鼻部に抗原刺激をすることにより血中の抗原特異的IgE抗体を増加させた鼻炎モデルマウスにおいて、経口投与により血中の抗原特異的IgE抗体を減少させる乳酸菌であることを特徴とする請求項5記載の使用。

- 10 9. アレルギーを低減する方法であって、かかる低減を必要とする被検者に、有効用量のラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される乳酸菌を有効成分として含む抗アレルギー剤を投与する工程を含む、アレルギーを低減する方法。

- 15 10. 前記ラクトバチルス・アシドフィラスに属する乳酸菌がラクトバチルス・アシドフィラスCL0062株（特許生物寄託センター寄託番号FERM BP-4980）、CL92株（特許生物寄託センター寄託番号FERM BP-4981）またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるものである請求項9記載の方法。

- 20 11. 前記ラクトバチルス・ファーメンタムに属する乳酸菌がラクトバチルス・ファーメンタムCP34株（特許生物寄託センター寄託番号FERM BP-8383）である請求項9記載の方法。

12. 前記乳酸菌が、持続的に鼻部に抗原刺激をすることにより血中の抗原特異的IgE抗体を増加させた鼻炎モデルマウスにおいて、経口投与により血中の抗原特異的IgE抗体を減少させる乳酸菌であることを特徴とする請求項9記載の方法。
- 25



1/6

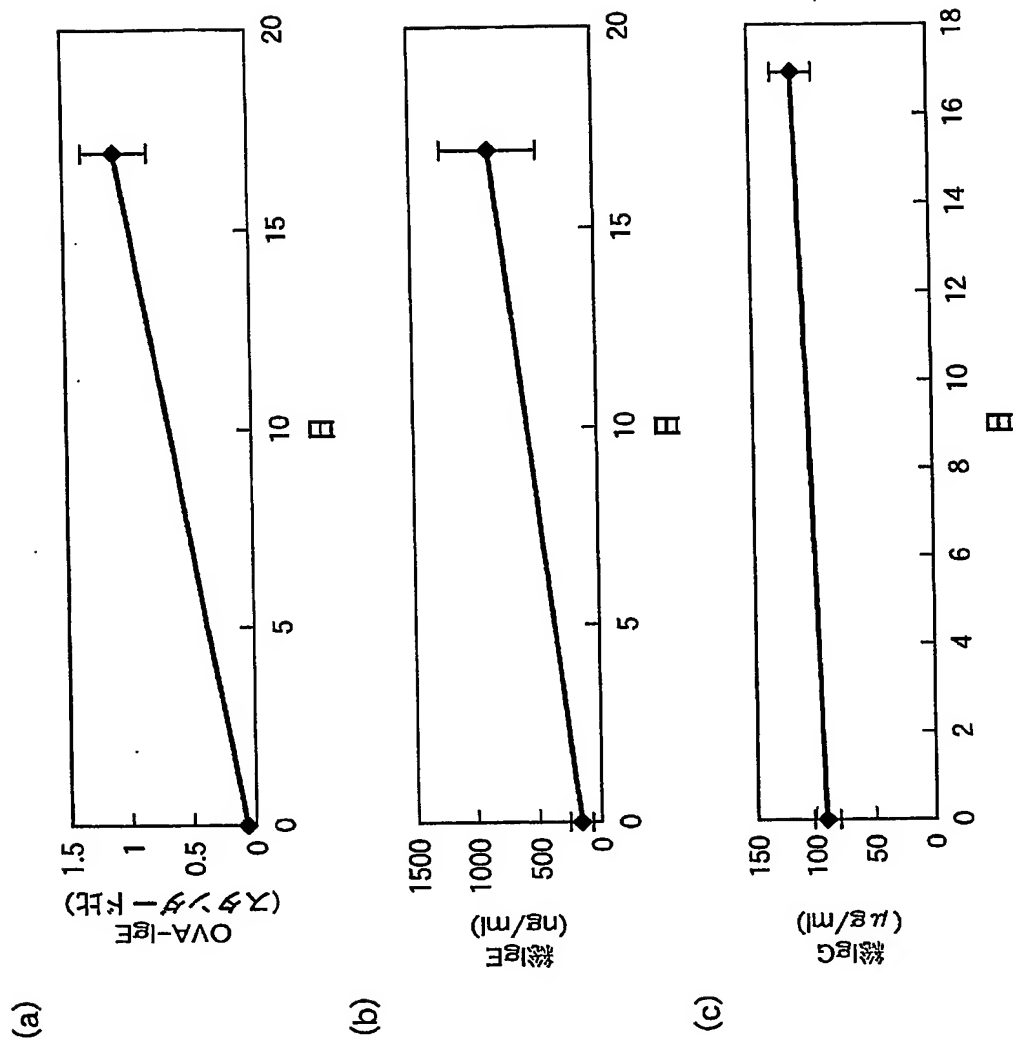
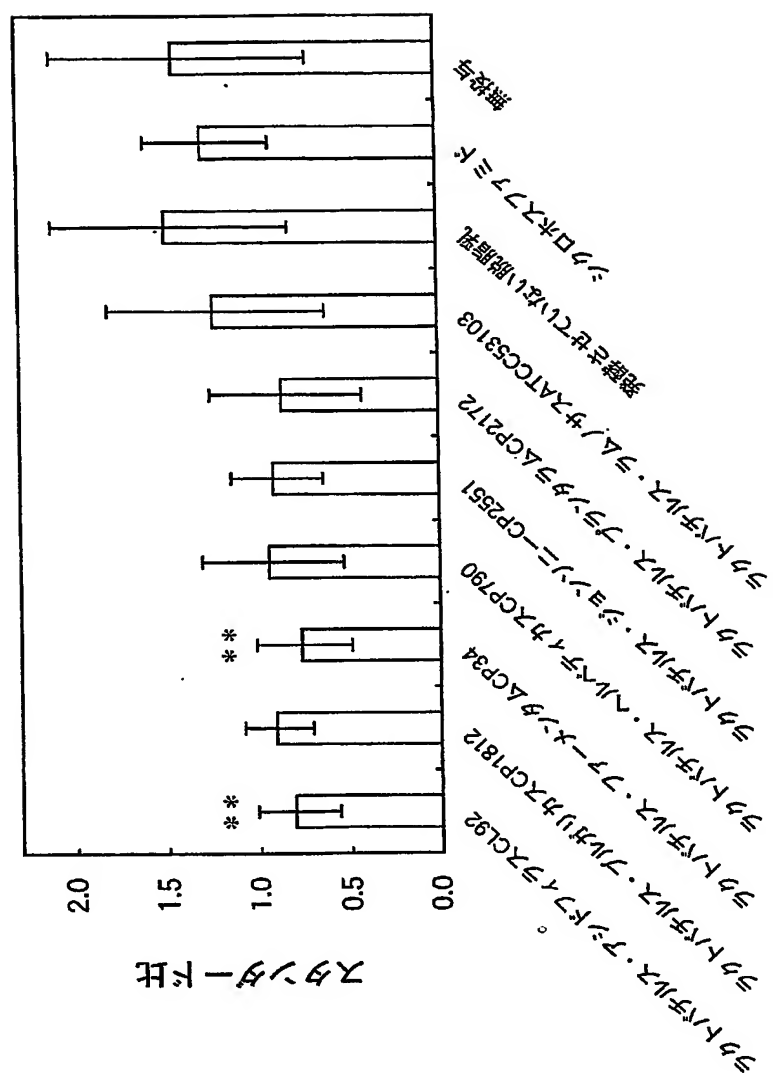
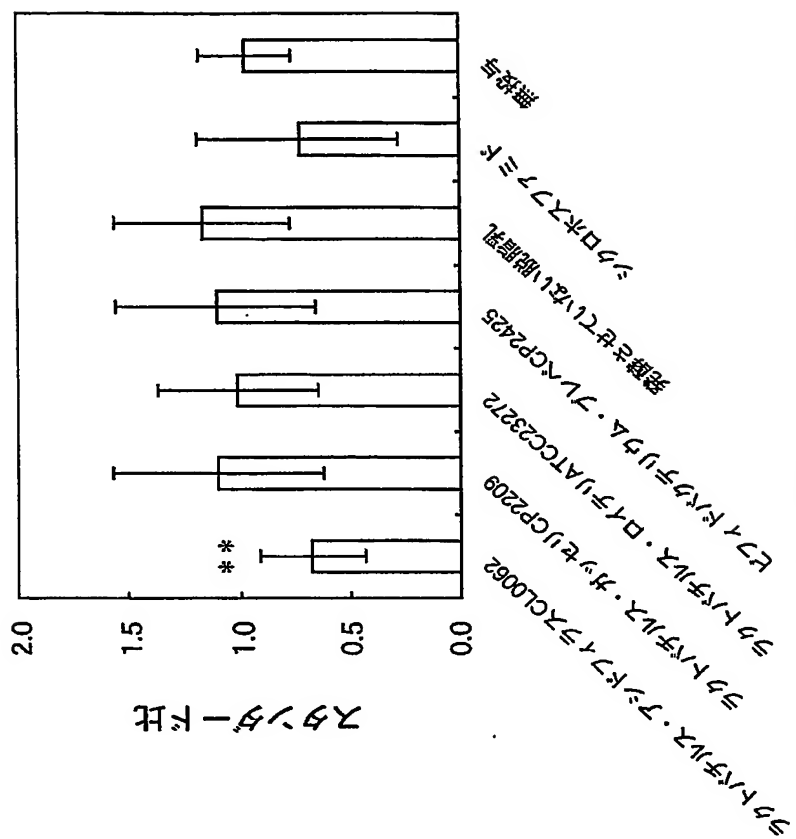


図1

\*\*\*:発酵させていない脱脂乳に対し $p<0.01$ 

2  
✕



\*\* : 発酵させていない脱脂乳に対し  $p < 0.01$

図3

4/6

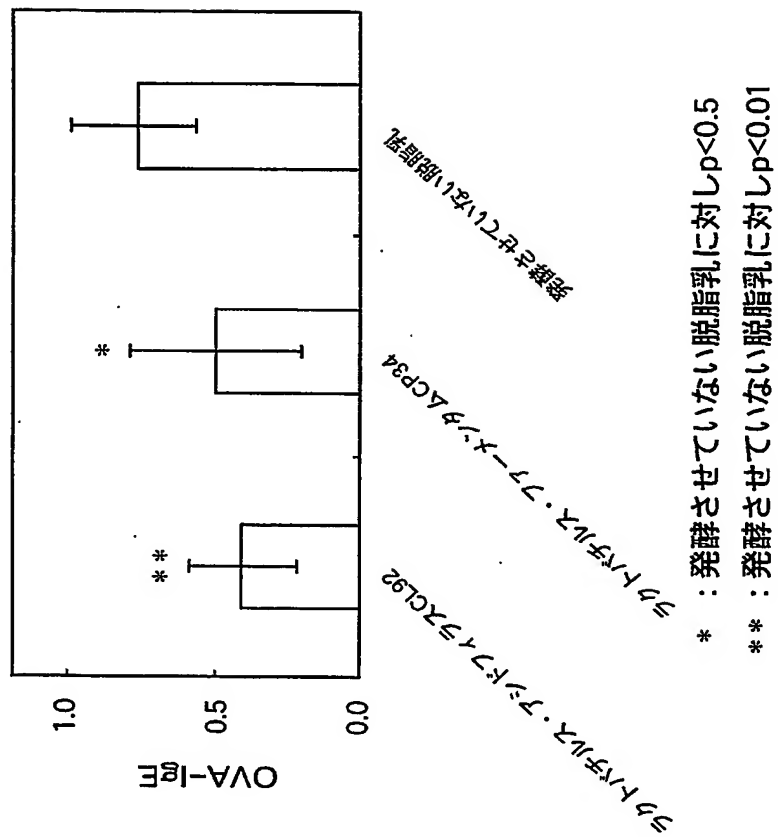


図4

5/6

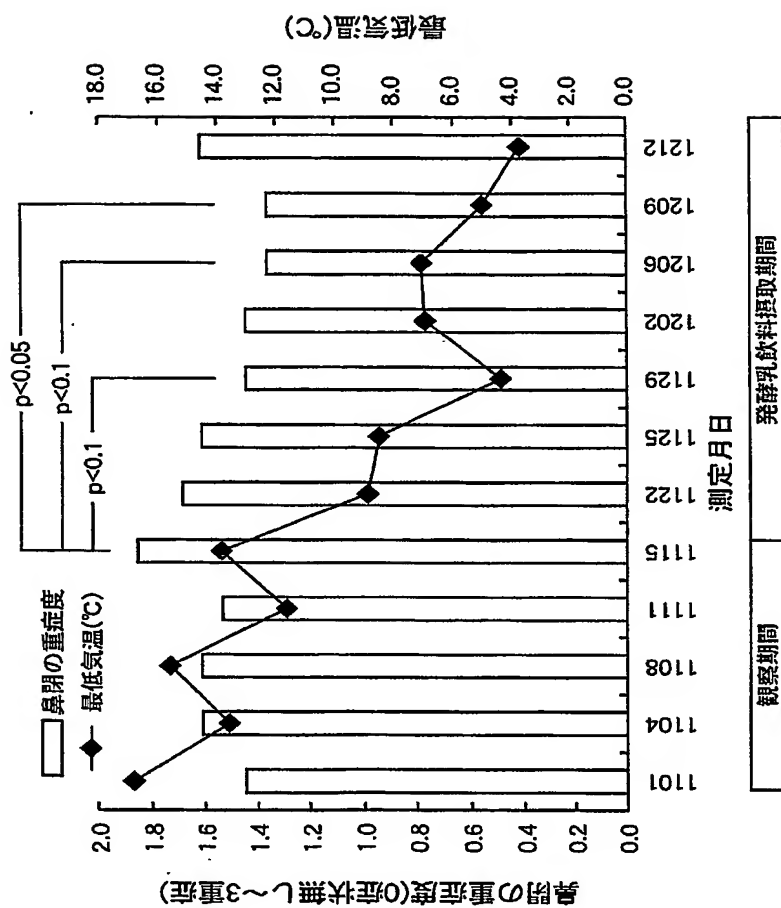


図5

6/6

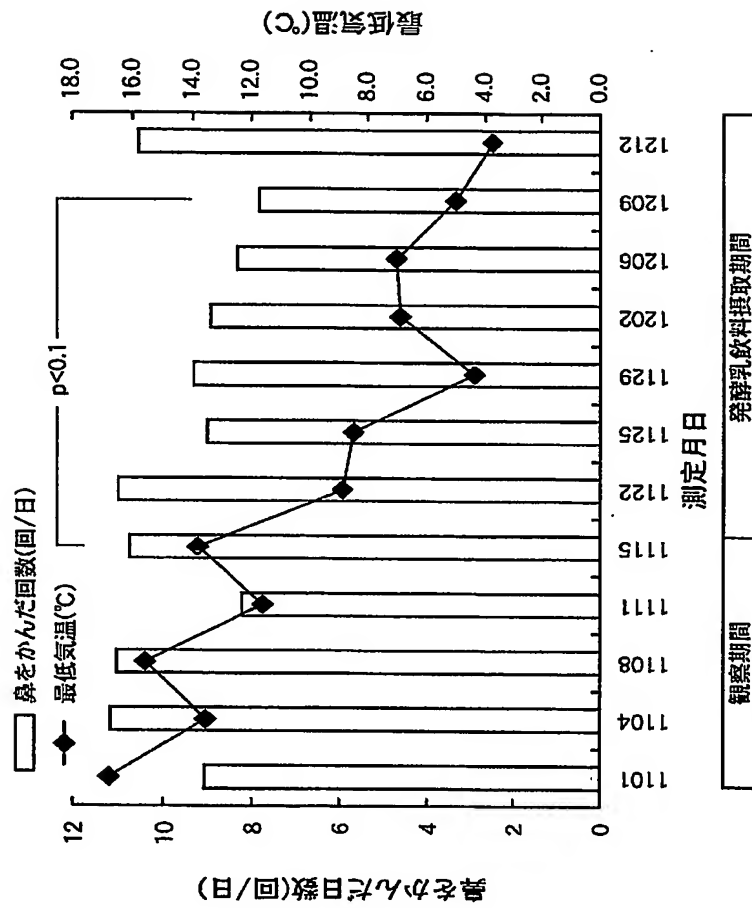


図6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

P JP03/08094

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K35/74, A61P11/02, 11/06, 17/00, 37/08, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K35/74, A61P11/02, 11/06, 17/00, 37/08, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), WPIL (QUESTEL), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/37865 A1 (PROBIALL PTY LTD.), 31 May, 2001 (31.05.01), Particularly, abstract; Claims & EP 1229930 A1 & JP 2003-514869 A & AU 200113734 A & BR 20015698 A & KR 2002084066 A & CN 1391480 A	1-8
X	DE 20202562 U1 (Orthomol pharmazeutische Vertriebs GmbH), 23 May, 2002 (23.05.02), Particularly, Zusammenfassung, SCHUTZANSPRÜCHE, page 1, lines 1 to 9 (Family: none)	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 September, 2003 (08.09.03)

Date of mailing of the international search report  
24 September, 2003 (24.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PC P03/08094

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/14485 A1 (Taketoshi YAMADA), 01 June, 1995 (01.06.95), Particularly, abstract; Claims & JP 7-265064 A & JP 7-308151 A & AU 9510765 A	1-8
X	JP 9-2959 A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 07 January, 1997 (07.01.97), Particularly, abstract; Claims (Family: none)	1-8
X	JP 2000-86524 A (Iryohojin Shadan Seirankai), 28 March, 2000 (28.03.00), Particularly, abstract; Claims; Par. No. [0008] (Family: none)	1-8
P,X	Takashi NAKAMURA et al., "Lactobacillus acidophilus L92 Kabu no Keiko Toyo ga Mouse Kesseichu no Ranpaku Albumin Tokuiteki IgE Kotai Revel ni Oyobosu Eikyo", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu, 2003 March, Vol.2003, page 75	1-8
P,X	Suguru ISHIDA et al., "Lactobacillus acidophilus L92 Kabu Hakkonyu no Sesshu ni yoru Kafunsho Shojo Kaizen Sayo no Kensho", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu, 2003 March, Vol.2003, page 75	1-8
A	JP 2000-239175 A (Karupisu Kabushiki Kaisha), 05 September, 2000 (05.09.00), (Family: none)	1-8
A	WO 01/97822 A1 (OY ABOTECH AB), 27 December, 2001 (27.12.01), & EP 1296694 A1 & FI 200001460 A & AU 200172572 A & FI 110668 B1	1-8
A	WO 02/16554 A1 (Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 February, 2002 (08.02.02), & EP 1312667 A1 & US 2003/0157079 A1 & AU 200180178 A	1-8
A	JP 2000-95697 A (Kabushiki Kaisha Advance), 04 April, 2000 (04.04.00), (Family: none)	1-8
A	JP 10-309178 A (Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd.), 24 November, 1998 (24.11.98), (Family: none)	1-8



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PC P03/08094

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-114667 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 06 May, 1998 (06.05.98), (Family: none)	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

P JP03/08094

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9-12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 9 to 12 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K35/74, A61P11/02, 11/06, 17/00, 37/08, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K35/74, A61P11/02, 11/06, 17/00, 37/08, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), WPIL(QUESTEL), JICST(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/37865 A1(PROBIALL PTY LIMITED)2001.05.31 特に、Abstract, Claims & EP 1229930 A1 & JP 2003-514869 A & AU 200113734 A & BR 200015698 A & KR 2002084066 A & CN 1391480 A	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.09.03

国際調査報告の発送日

24.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝原 下 浩吉



4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	DE 20202562 U1(Orthomol pharmazeutische Vertriebs GmbH) 2002.05.23 特に、Zusammenfassung, SCHUTZANSPRÜCHE, 第1ページ 第1-9 行 (ファミリーなし)	1-8
X	WO 95/14485 A1(山田武敏)1995.06.01 特に、Abstract, 請求の範囲 & JP 7-265064 A & JP 7-308151 A & AU 9510765 A	1-8
X	JP 9-2959 A(株式会社ヤクルト)1997.01.07 特に、【要約】、【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-8
X	JP 2000-86524 A(医療法人社団青藍会)2000.03.28 特に、【要約】、【特許請求の範囲】、【0008】 (ファミリーなし)	1-8
PX	仲村 太志 等、Lactobacillus acidophilus L92株の経口投与が マウス血清中の卵白アルブミン特異的IgE抗体レベルに及ぼす影 響、日本農芸化学会大会講演要旨集、2003年3月、Vol. 2003. p. 75	1-8
PX	石田 優 等、Lactobacillus acidophilus L92株発酵乳の摂取に よる花粉症症状改善作用の検証、日本農芸化学会大会講演要旨集、 2003年3月、Vol. 2003. p. 75	1-8
A	JP 2000-239175 A(カルピス株式会社)2000.09.05 (ファミリーなし)	1-8
A	WO 01/97822 A1(OY ABOTECH AB)2001.12.27 & EP 1296694 A1 & FI 200001460 A & AU 200172572 A & FI 110668 B1	1-8
A	WO 02/16554 A1(わかもと製薬株式会社)2002.02.08 & EP 1312667 A1 & US 2003/0157079 A1 & AU 200180178 A	1-8
A	JP 2000-95697 A(株式会社アドバンス)2000.04.04 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 10-309178 A(わかもと製薬株式会社)1998.11.24 (ファミリーなし)	1-8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 10-114667 A(武田薬品工業株式会社)1998.05.06 (ファミリーなし)	1 - 8

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲9-12は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。